

別紙 1

論文審査の要旨

報告番号	甲第2778号	氏名	伊藤 千洋
論文審査担当者	主査 教授 高見 正道 副査 教授 中村 雅典 副査 教授 上條 竜太郎		
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Tumor protein D 52 and 54 have opposite effects on the terminal differentiation of chondrocytes」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>TPD52、53、及び 54 遺伝子は種々の癌細胞に発現しているが、生体組織における生理的役割は不明である。学位申請者 伊藤千洋氏はラットの骨組織におけるこれらの遺伝子発現について解析した。その結果、骨の関節軟骨と一次骨梁に TPD52、53、及び 54 の発現を認め、骨芽細胞と軟骨細胞の細胞株を用いた解析結果から、細胞分化過程においてこれらの発現レベルが変化することを見出した。さらなる解析により、TPD52 が軟骨分化に関与する ALPase 活性、X 型コラーゲンの発現レベルを調節することが明らかになった。これらの結果から、TPD ファミリーは正常な骨組織において軟骨細胞に関与する遺伝子の発現レベルを調節することにより、軟骨細胞の増殖や分化を制御する重要な役割を担うことが示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の中村雅典委員および上條竜太郎委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>中村雅典委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>1. 永久軟骨では発現が認められるのか、初代培養や他の細胞株でも同様であると考えるか。</p> <p>永久軟骨における TDP タンパク質の発現は現在のところ不明であるが TPD52 ファミリー分子の発現は認められると考えている。初代培養した正常ヒト軟骨細胞 (NHAC-kn 株) を用いて ATDC5 細胞と同じように生物学的アッセイと RT-qPCR にて検索を行ったところ、軟骨前駆細胞として知られる ATDC5 細胞の方が NHAC-kn 株より強い反応を示した。そのことに関しては、NHAC-kn 株は膝関節軟骨の細胞であるため細胞の系統が異なっており、軟骨細胞の分化の途中で発現レベルが変化するためではないかと推察する。</p> <p>2. TPD52 ファミリー遺伝子のうち複数の発現を強制あるいは阻害した場合はどうなるか。</p> <p>今回の研究では、生物学的アッセイ法と RT-qPCR 法を用いた解析結果より、TPD52 と TPD54 が軟骨細胞の分化過程において発現していることが予測された。そこで TPD52 と TPD54 の強制発現とノックダウンの組み合わせによる解析を実施した。その結果、強制発現とノックダウンの相乗・相加作用は認められなかった。TPD52 ファミリータンパク質はコイルドコイルモチーフを持ち、MAL2 などのタンパクと結合することが報告されており、それらの結合タンパクの関与を含めて今後解析する必要がある。</p>			

上條竜太郎委員の質問とそれらに対する回答：

1. 本論文の Fig. 1 で、12 週齢のラット成長板軟骨で TPDs の発現が認められていないが、他の観察時期（週齢）については確認したのか。

ラットは 12 週齢以降も成長するのでまだ成長板は十分開いていて成長板を観察するのに問題は無いと考えた。また、過去の論文でも 12 週齢のラットを使用して成長板を観察しているものがあり、本研究結果と比較検討できることも理由の一つである。しかしながら、4 週齢程度のラットなどもっと週齢が若いラットでも検討することで新たに重要な知見が得られると考えている。

2. 本論文 Fig 2I において TPD54 が ALP mRNA レベルを上昇させる一方、FIG2G で ALP 活性、fig2H で Calcium deposition が TPD54 で誘導されないことが示されている。この相違について説明せよ。

Fig 2 では骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いた解析を実施し、その結果から TPD52 ファミリーは MC3T3-E1 細胞の分化に関しては何らかの機能を担っている可能性が低いと判断した。本論文中、FIG2 は A～E までは TPD52 ファミリーの強制発現による結果であり、F～J まではノックダウンによる結果である。これらの強制発現群とノックダウン群で結果が相反することではなく、細胞の培養日数を調整して再現試験を実施したものの TPD52 ファミリーの強制発現またはノックダウンによる影響が現れるようなデータは得られなかった。よって Fig 2 に示すように、TPD52 ファミリーの強制発現またはノックダウンが骨芽細胞の分化には影響しないと結論づけた。

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 高見正道委員の質問とそれらに対する回答：

1. 軟骨細胞分化における TPD52 と TPD54 の相互作用について考察せよ。

TPD52 と TPD54 の直接的な相互作用は不明だが、癌細胞において TPD52 は Akt/PKB のリン酸化を亢進し、癌の悪性化を増加させることが報告されている。一方、TPD54 は Akt/PKB 経路を抑制するということが報告されている。今回の結果から、軟骨細胞において TPD52 が Akt/PKB 経路に関与し、さらに TPD52 ファミリータンパク質はコイルドコイルモチーフを持つため、MAL2 などのタンパク質と結合する可能性があると考ええる。

2. 歯科医学における本研究結果の意義について説明せよ。

今回の研究では TPD52 ファミリーの強制発現と siRNA による発現抑制を行い、TPD52 と TPD54 の発現バランスに異常が起きると何らかの軟骨異常が起きるの可能性が示唆された。このことから TPD52 ファミリーの内軟骨性骨化における役割をさらに詳細に解析することによって、得られる結果が骨、軟骨の再生医療の基礎となりうることで、すなわち、薬物等によって TPD52 と TPD54 の発現バランスを調整することで腫瘍、嚢胞による顎骨切除後の症例に対する骨の再生を促進できる可能性がある。また、歯周病により失われた歯槽骨の再生、インプラントの骨量不足症例に対する骨の再生や口唇口蓋裂患者における鼻翼軟骨の再生などに本研究結果が貢献できると考える。

主査の高見正道委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。